

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

E6410

(11)Publication number : 09-105738

(43)Date of publication of application : 22.04.1997

(51)Int.Cl.

G01N 27/447
G01N 21/64
G01N 33/50

(21)Application number : 07-261597

(71)Applicant : HITACHI LTD

(22)Date of filing : 09.10.1995

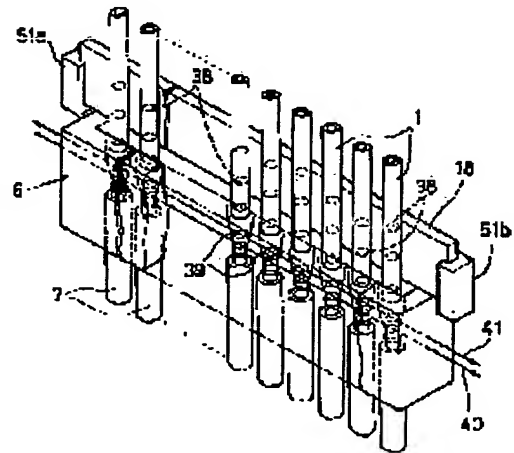
(72)Inventor : YAMADA HISASHI
TAKAHASHI SATOSHI
KANBARA HIDEKI

(54) FLUORESCENCE DETECTING TYPE CAPILLARY ARRAY ELECTROPHORETIC DEVICE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To improve the flatness of each capillary end constituting a capillary array, in a capillary array electrophoretic device using polychromatic phosphor, and also prevent the reduction by half in quantity of light by superposition of an exciting laser beam and the reduction in sensitivity by superposition of back light.

SOLUTION: The eluting end of a gel-filled capillary array 1 is nipped by the inner wall of an optical cell 6, or the vicinity of the eluting end of the gel-filled capillary array 1 is held on a flat plate 18, thereby, the array 1 is held within the same plane with a sufficient precision. When a plurality of exciting lights differed in wavelength characteristic are emitted, the emitting position of each exciting light 40, 41 is set to have different distances from the eluting end of the gel-filled capillary 1, thereby, the attenuation of laser beam, the rise of background light, and the increase in noise by superposition of laser beam are avoided.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

09.04.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-105738

(43) 公開日 平成9年(1997)4月22日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N	27/447		G 0 1 N 27/26	3 1 5 K
	21/64		21/64	Z
	33/50		33/50	P
			27/26	3 2 5 A

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 11 頁)

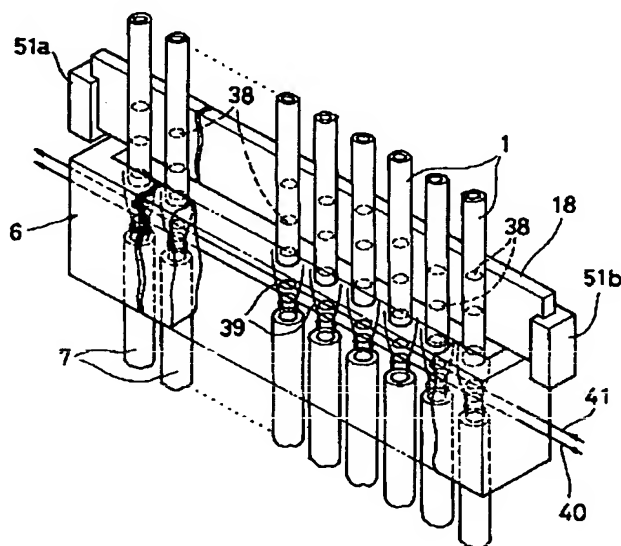
(21) 出願番号	特願平7-261597	(71) 出願人	000005108 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地
(22) 出願日	平成7年(1995)10月9日	(72) 発明者	山田 尚志 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内
		(72) 発明者	高橋 智 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内
		(72) 発明者	神原 秀記 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内
		(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔

(54) 【発明の名称】 蛍光検出型キャピラリーアレー電気泳動装置

(57) 【要約】

【課題】 多色蛍光体を用いたキャピラリーアレー電気泳動装置において、キャピラリーアレーを構成する各キャピラリー端の平面性向上、及び励起用レーザ光を重畳することによる光量半減や背景光重畳による感度低下を防止する。

【解決手段】 ゲル充填キャピラリーアレー1の溶出端を光学セル6の内壁で挟むことによって、あるいはゲル充填キャピラリーアレー1の溶出端付近を平板18上に保持することによって、十分な精度で同一平面内に保持する。波長特性の異なる複数の励起光を照射する場合には、各励起光40、41の照射位置をゲル充填キャピラリー1の溶出端から異なる距離とすることで、レーザ光を重畳した場合のレーザ光の減衰、背景光の上昇、ノイズの増大を回避する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 複数のゲル充填キャピラリーを用いた蛍光検出型電気泳動装置において、前記複数のゲル充填キャピラリーは2枚の平板によって溶出端が挟まれて同一平面内に保持されていることを特徴とする蛍光検出型電気泳動装置。

【請求項2】 複数のゲル充填キャピラリーを用いた蛍光検出型電気泳動装置において、前記複数のゲル充填キャピラリーは光学セルの内壁によって溶出端が挟まれて同一平面内に保持されていることを特徴とする蛍光検出型電気泳動装置。

【請求項3】 複数のゲル充填キャピラリーを用いた蛍光検出型電気泳動装置において、前記複数のゲル充填キャピラリーは光学セルの一方の内壁とそれに対向する可動平板によって溶出端が挟まれて同一平面内に保持されていることを特徴とする蛍光検出型電気泳動装置。

【請求項4】 複数のゲル充填キャピラリーを用いた蛍光検出型電気泳動装置において、前記複数のゲル充填キャピラリーは溶出端付近が平板上に保持されて同一平面内に保持され、前記溶出端は光学セル内に位置することを特徴とする蛍光検出型電気泳動装置。

【請求項5】 複数のゲル充填キャピラリーの溶出端に、シース液の流れによるシースフローが存在することを特徴とする請求項1～4のいずれか1項記載の蛍光検出型電気泳動装置。

【請求項6】 複数のゲル充填キャピラリーと複数のシース液通路が交互に並べられて配置され、前記シース液通路にシース液を流すことにより、前記複数のゲル充填キャピラリーの溶出端にシースフローが形成されることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項記載の蛍光検出型電気泳動装置。

【請求項7】 複数のゲル充填キャピラリーと複数の中空キャピラリーが交互に並べられて配置され、前記複数の中空キャピラリーにシース液を流すことにより、前記複数のゲル充填キャピラリーの溶出端にシースフローが形成されることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項記載の蛍光検出型電気泳動装置。

【請求項8】 光学セルの照射領域に位置するキャピラリーの周囲を屈折率1.2～1.4の流動性物質で満たしたことを特徴とする請求項1～4のいずれか1項記載の蛍光検出型電気泳動装置。

【請求項9】 光学セルの照射領域に位置するキャピラリーの周囲を屈折率1.4～1.6の流動性物質で満たしたことを特徴とする請求項1～4のいずれか1項記載の蛍光検出型電気泳動装置。

【請求項10】 波長特性の異なる複数の励起光を使用し、各励起光はゲル充填キャピラリーの溶出端から異なる距離の位置に照射されることを特徴とする請求項1～9のいずれか1項記載の蛍光検出型電気泳動装置。

【請求項11】 レーザ光を複数のゲル充填キャピラリ

ーが並ぶ平面と同一平面方向から光学セルに入射することを特徴とする請求項1～10のいずれか1項記載の蛍光検出型電気泳動装置。

【請求項12】 レーザ光を複数のゲル充填キャピラリーが並ぶ平面と交差する方向から光学セルに入射することを特徴とする請求項1～10のいずれか1項記載の蛍光検出型電気泳動装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、レーザ誘起蛍光法を用いたDNA等生体物質分析用キャピラリーアレー電気泳動装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 ゲノム計画の進展に伴い、大量のDNA塩基配列決定が課題となっている。DNAの塩基配列決定にはラジオアイソトープ標識を用いたオートラジオグラフィが用いられていた。最近、これに代わって蛍光標識を用いた自動DNA塩基配列決定装置、すなわちDNAシーケンサが開発され用いられている。

【0003】 DNAシーケンサは、DNAを構成する4つの塩基A、C、G、Tの配列を決定する装置である。その原理は、DNA試料の末端の4つの塩基各々に対応させた蛍光体でDNAを標識し、標識されたDNA試料をゲル中で電気泳動して分離し、分離したDNA試料をレーザ光で照射し、レーザ光によって試料中の蛍光標識を励起し、この励起による発光を計測し、その発光波長から末端塩基種を短いDNAから順次判別し、その順番から配列を決定する、という手順を踏むものである。このDNAシーケンサで一度に配列決定できる試料数は24～36サンプルで、400～500塩基の決定に8～10時間を必要としている。そこでより大容量の処理能力を持ったDNAシーケンサの開発が望まれている。

【0004】 DNA試料を大量に処理するには、電気泳動の速度を速くすること、電気泳動のレーンを多くすること、同一レーンに複数のDNA試料を電気泳動すること等が有効である。電気泳動の速度を速くするには印加電圧を高くすれば良い。しかし、電圧が高くなるとジュール熱の発生も大きくなるので、放熱効率を上げなければならない。板ゲルではゲルを薄くすることで放熱効率を上げているが限界がある。一方、毛细管にゲルを充填して用いるキャピラリーゲルは径が0.05～0.1mmと細く、その形状から放熱効率が高いためジュール熱による温度上昇を招くことなく高電界をかけることができるので、電気泳動の速度を速くするのに向いている(Anal. Chem. 62, 900-903, 1990)。そこで高スループットを実現するためにキャピラリーを多数本並べた装置が考案されている(Nature 359, 167, 1992; Nature 361, 565, 1993)。

【0005】 キャピラリーを多数本並べたキャピラリーアレーを用いて計測を行うためには、多数のキャピラリ

一を同時に光照射し、発する蛍光を受光検出する必要があるが、有力な方法にシースフローを用いる方式がある。すなわち多数のゲル充填キャピラリーを分析部として用いるが、その端部をバッファー液中に入れ、溶出してくるDNA断片に光を照射して蛍光を検出する。ゲルから溶出するDNA断片が拡散で広がり分離能等を低下させないように、ゲル端部近傍にはバッファー液によるシースフローが形成されている。この方式を用いると一度に100サンプルも解析でき、計測に要する時間も2時間程度であり、大きなスループットが得られる。

【0006】DNA断片に光照射する励起光源には通常Ar⁺レーザ光(488nm)が多く用いられるが、蛍光極大波長が互いに異なる(従って最適励起波長も異なる)4種類の蛍光体を1種類のレーザ光で励起すると、最適励起波長がレーザ波長から離れた蛍光体は励起効率が低くなり高い感度が得られない。そこで2種類のレーザ光を用いて、各レーザ光に対応する比較的励起効率の高い2組の蛍光体をそれぞれ励起することが有利である。例えば、Ar⁺レーザ光でFITC (fluorescein-5-isothiocyanate 発光極大波長515nm)及びFITC-C12 (dichloro-FITC 発光極大波長529nm)等を励起し、He-Neレーザ光(594nm)でTexas Red (登録商標) (Sulforhodamine 101 発光極大波長607nm)あるいはCy-5 (登録商標) (発光波長667nm)等を励起する。もちろん1つのレーザ光で3種類の蛍光体を効率良く励起できる場合もあり、この限りではない。1つのレーザ光で3種類の蛍光体を励起する例としては、Ar⁺レーザ光でFITCを励起し、YAGレーザ光(532nm)で3種類の蛍光体JOE (登録商標) (発光極大波長555nm)、TAMRA (登録商標) (Tetra Methyl Rhodamine 発光波長585nm)、ROX (登録商標) (Rhodamine X 発光極大波長615nm)を励起する場合がある。

【0007】これら多数の蛍光体を2種類のレーザ光で励起するために、2つのレーザ光を重畳して平面状に並んだキャピラリー端部近傍をキャピラリーアレー面に沿って泳動路照射を行う。このようにして同時に照射された多数のDNA断片から発する蛍光を分光受光して、DNA断片の末端塩基種を判別し、その順序から塩基配列決定を行なう。この種の装置は、DNAシーケンサーとしての用途以外に、蛍光標識された生体関連物質の分析に幅広く活用できるものである。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】キャピラリーアレーの光照射方法には、レーザ光をスキャンして1本1本のキャピラリーを順次照射する方法と、並べたキャピラリーを横から同時に照射する方法がある。後者の方がレーザ光を有効に使える利点があるが、照射される部位近傍におかれるキャピラリーアレーを構成する各キャピラリー

端を同一平面に保つことが必要である。しかし、キャピラリーが柔らかいため、先端をフリーの状態にして平面に保つのは難しかった。この結果、レーザ光照射部からはずれたところをDNA断片が通過し、計測ミスをするものがしばしば起こった。

【0009】また、複数のレーザ光を用いる場合レーザ光を重畳させて用いるが、これは異なるレーザ光で励起される蛍光体で標識されたDNAのフェログラムを比較して厳密な解析をする場合に必要である。この場合、励起用レーザ光はハーフミラーを用いて重畳するが、光量がこれにより半減してしまう上、両励起光に起因する背景光がやはり重畳されて大きくなり、高い検出感度が得にくい難点があった。

【0010】本発明は、これら従来技術の問題点に鑑みてなされたものであり、光学系に対してキャピラリーアレーが高精度に位置決めされたキャピラリーアレー電気泳動装置を提供することを目的とする。本発明はまた、背景光信号強度が小さく高感度な電気泳動装置を提供することを目的とする。本発明はまた、均一なシースフローを流すことのできるキャピラリーアレー電気泳動装置を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明においては、ゲル充填キャピラリーアレーの溶出端を2枚の平板で挟むことによって十分な精度で同一平面内に保持する。2枚の平板は光学セルの内壁とすることができ、ゲル充填キャピラリーアレーの溶出端を光学セルの内壁で挟む操作は、ゲル充填キャピラリーの外径にほぼ等しい寸法を有する光学セルの内壁間隙にゲル充填キャピラリーアレーの溶出端を挿入することによって行うことができる。あるいは光学セル内に可動平板を設け、光学セルの内壁とこの可動平板によってゲル充填キャピラリーアレーの溶出端を挟んでもよい。また、ゲル充填キャピラリーアレーの溶出端付近を平板上に固定して保持することによっても、十分な精度で同一平面内に保持することができる。

【0012】ゲル充填キャピラリーアレーの溶出端を同一平面内に保持することにより、ゲル充填キャピラリーアレーが並ぶ方向と同一平面方向からレーザ光を照射する測定法での測定精度を向上することができる。蛍光を励起するための光照射位置はゲル充填キャピラリーの溶出端より下流側に設定し、ゲル充填キャピラリーから溶出したDNA断片は緩衝液等からなるシース液の流れ、すなわちシースフローで光照射位置まで運搬することができる。このとき、ゲル充填キャピラリーとシース液の流れる通路を交互に並べて配置すると、均一で安定したシースフローを形成することができる。シース液通路は、ゲル充填キャピラリーに接して交互に並べた中空キャピラリーによって実現してもよい。

【0013】波長特性の異なる複数の励起光を使用する

場合には、各励起光の照射位置をゲル充填キャピラリーの溶出端から異なる距離とする。このことにより、レーザ光を重ねた場合のレーザ光の減衰、背景光の上昇、ノイズの増大を回避することができる。そのため計測に使用できるダイナミックレンジを広く取ることができ、S/Nの低下がない。なお、シースフロー中でのDNA試料の移動速度は電界ではなくシースフローの速度で決まり、DNA試料は塩基長によらず常に一定時間で複数の光照射位置の間を移動する。このため励起光の照射位置の相違による蛍光発生タイミングのずれを補正して、シーケンスパターンの比較を行うのは容易である。

【0014】また、光学セル内をキャピラリー材料やキャピラリー内物質と同程度の屈折率を有する物質で満たすことにより、シースフローを使わずにキャピラリーに光照射して計測を行う場合にも光散乱や屈折を抑制して高精度な測定を行うことができる。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、図面を用いて本発明の実施の形態を詳細に説明する。

【実施の形態1】図1は、本発明によるマルチキャピラリーDNAシーケンサの全体構成の一例を示す図である。マルチキャピラリーDNAシーケンサは、ゲル充填キャピラリー1、緩衝液槽2、上部電極槽3、下部電極槽4、電源5、光学セル6、中空キャピラリー7、ミラー8、9、レーザ光源10、11、レンズ12、13、蛍光用フィルタ14、像分割プリズム15、蛍光検出器16、コンピュータ17からなり、計測部にシースフローを形成し、2本のレーザ光40、41でシースフロー部の異なる位置を照射する。

【0016】各ゲル充填キャピラリー1は、試料注入端を図示しない試料容器中の試料に浸漬して電圧を印加することでDNA試料を電界注入し、そのうち試料注入端を上部電極槽3に挿入する。次いで、電源5を動作させて上部電極槽3と下部電極槽4の間に電圧を印加することで、電界注入されたDNA試料はゲル充填キャピラリー1中を電気泳動して分離される。緩衝液は、緩衝液槽2から送られて光学セル6中を満たし、下部の中空キャピラリー7へと流入し、下部電極槽4へ排出される。分離されたDNA試料がこの光学セル6を通過するとき、ミラー8及びミラー9により誘導されてきたレーザ光40、41の照射により、試料を標識している蛍光体が励起され蛍光を発する。この蛍光発光は、集光レンズ12、垂直方向に並べられた複数の蛍光用フィルタ14、各蛍光毎に像を分ける像分割プリズム15及び結像レンズ13を通り、蛍光検出器16に到達し検出される。

【0017】蛍光検出器16は冷却CCDカメラ等の2次元撮像装置からなる。蛍光用フィルタ14は、図の例では4種類の蛍光体の蛍光波長を各々分離して透過させる4枚のフィルタからなり、蛍光用フィルタ14

によって分離された4種類の蛍光体の像は、像分離プリズム15及び結像レンズ13によって2次元撮像装置の撮像面に上下方向に分離して結像される。蛍光検出器16によって検出された信号はコンピュータ17へ送られて解析され、試料の塩基配列が決定される。

【0018】図2は光学セル6の部分の詳細説明図、図3はその側断面図である。緩衝液で満たされた光学セル6の前後の無蛍光透明ガラス板6a、6bの間隔は0.22mmであり、この間隙に上から外径0.2mmのゲル充填キャピラリー1が挿入されている。ゲル充填キャピラリー1は、平板18上に例えば0.4mmピッチでアレー状に接着されて保持されており、各ゲル充填キャピラリー1に対向して中空キャピラリー7が下部に配置されている。平面状に整列したゲル充填キャピラリー1と中空キャピラリー7との間隔は約5mmであり、この間隙を平行な2本のレーザ光40、41が通過している。このように、ゲル充填キャピラリー1の先端はキャピラリーの外径程度のガラス間隙に保持されているため、十分な精度で同一平面内に保持される。なお、光学セル6は、少なくともレーザ光の入射領域及び蛍光取り出し領域が透明であればよく、必ずしも全部の壁面を透明部材で作製する必要はない。

【0019】図3に示すように、光学セル6の上方には緩衝液容器50が設けられ、緩衝液槽2から送られてきた緩衝液は緩衝液容器50に入ったのち光学セル中を上から下へ流れる。なお、緩衝液容器50の側壁には案内溝を有するガイド部材51a、51bが取り付けられており、多数本のゲル充填キャピラリー1を保持した平板18の端部をガイド部材51a、51bの案内溝に挿入することによって、平面状に揃えられたゲル充填キャピラリー1の先端が光学セル6中の所定位置に配置される。

【0020】ゲル充填キャピラリー1で分離されたDNA断片38は、ゲル充填キャピラリー1から緩衝液中へ溶出してくると拡散で広がろうとするが、重力による自然落下で層流状態を保ちながら下方へと移動するシースフロー（緩衝液流）39によって搬送され、拡散する前にレーザ光40、41の光路を横切り、光照射されて蛍光を発する。各ゲル充填キャピラリー1で分離されたDNA断片38は、互いに平面性を保ったまま混ざり合うことなくシースフロー39により搬送されるので、レーザ光40、41により一斉に照射できる。DNA断片38と緩衝液は中空キャピラリー7を通過して下部電極槽4へ排出される。

【0021】DNA断片38のシースフロー39中での移動速度は約0.1mm/sである。この時ゲル充填キャピラリー1の溶出端から0.5mm及び1mmの位置をレーザ10、11からのレーザ光40、41で照射し、蛍光信号を求める。この2本のレーザ光間の距離0.5mmをDNA断片38が移動する時間は約5秒で

あり、この時間は塩基長に依らず一定である。図4は、シースフロー中でのDNA断片の移動速度の比を、20塩基長のDNA断片の速度を1として150塩基長、300塩基長、400塩基長のDNA断片について測定した結果を示したものである。図4から、シースフロー中でのDNA断片の移動速度が塩基長に依らず一定であることが良くわかる。このため、種々の蛍光体を励起するレーザ光40、41の照射位置が異なっているにもかかわらず、単に計測時間をシースフロー速度で決まる時間分ずらすだけで励起光照射位置のずれを相互に補正することができ、各DNA断片の相対泳動速度を比較し、塩基配列決定等を行うことができる。

【0022】次に、2本のレーザ光40、41の光路をずらした理由について説明する。レーザ光で水溶液を照射すると、水のラマン散乱に基づく強い信号がレーザ光の波長から約100nm長波長側に観測される。1つのレーザ光で1つの蛍光体を励起する場合には、発する蛍光の極大は通常最適励起波長の20~30nm長波長側に現われるので、この波長部分を透過させラマン線の部分を遮断するフィルターを介して受光することで、ラマン散乱の影響を受けずに蛍光検出を行うことができる。

【0023】しかし、複数のレーザ光を重畳して用いた場合、短波長側のレーザ光のラマン線が長波長側レーザ光で励起する蛍光体の蛍光極大波長に近い位置に来て背景光強度が増大し、高いS/Nが得られないことがある。実際488nmで励起すると、585nm近傍にラマン線が現われる。この波長は532nmで励起するTAMRAの蛍光極大波長に近いので、TAMRA用の透過フィルターを通り抜けてしまい、TAMRAに関しては高い感度が得られない。また、励起光532nmの散乱はFAM (5-carboxyfluorescein) やFITC用のフィルターで完全には遮断できず、背景光の増大すなわち感度の低下をもたらす。

【0024】そこで、本発明のように2本のレーザ光40、41の照射位置を空間的にずらし、位置分解能力のある検出器で受光することにより、これらの障害を除去することができる。実際、2本のレーザ光の照射位置をずらすと、2本のレーザ光を重畳した場合に比べ、FAM用フィルターで観測した背景光の信号強度は1/2、TAMRA用フィルターで観測した背景光の信号強度は1/4とすることができ、高感度化を達成することができた。

【0025】ゲル充填キャピラリーアレーを平面状に整列させる方法の一例として、ゲル充填キャピラリーアレーの溶出端をゲル充填キャピラリーの外径にほぼ等しい寸法を有する光学セル6のガラス板6a、6bの間隙に挿入する方法を説明した。この場合、光学セルのガラス板によって形成される間隙に、図5の断面に示すようにテーパ6cを設けると、ゲル充填キャピラリーアレーの挿入を容易に行うことができる。

【0026】また、ここでは予め組み立てられた光学セルの間隙にゲル充填キャピラリーの溶出端を挿入したが、内部に可動平板を備える光学セルを用い、可動平板と光学セル壁面の間隙を広げた状態でゲル充填キャピラリーアレーの先端をその間隙に挿入し、次いで可動平板をセル壁面の方向に移動することでゲル充填キャピラリーの溶出端を光学セル内に挟み込むようにすることもできる。図6は、この変形例を説明するための光学セル部分の断面図である。

【0027】図6に断面模式図を示した光学セル6は、蛍光取り出し側の壁面6bが無蛍光透明ガラスで作られ、その反対側の壁面6aがステンレス鋼で作られている。壁面6aには水平方向に延びる溝状の凹部が設けられ、その凹部に無蛍光透明ガラス製の平板61が挿入されている。平板61には裏側の3箇所に押圧部材62が取り付けられており、押圧部材62は壁面6aを貫通して光学セル外に延び、その端部に配置された圧縮バネ63によって矢印方向に付勢されている。従って、圧縮バネ63に抗して押圧部材62を図の左方向に移動させ、平板61と壁面6bの間隙を広げた状態でゲル充填キャピラリーアレーの先端を挿入し、そのうち押圧部材62を離すことにより、ゲル充填キャピラリー1は壁面6bと平板61に挟まれて同一平面上に整列する。

【0028】また、光学セルのガラス板6a、6bの間隔がゲル充填キャピラリーの外径より大きい場合であっても、ゲル充填キャピラリーアレーを固定した平板18から突出させるキャピラリー1の自由端の長さを十分短くすると、平板18への固定のみでゲル充填キャピラリーアレーの溶出端を十分な精度をもって一直線上に揃えることができる。例えば、外径0.2mm、内径0.1mmのゲル充填キャピラリーの場合、固定平板18から突出するキャピラリーの長さを5mm以下とすると、光学セルのガラス板6a、6bで挟んで位置を規制せずともゲル充填キャピラリーアレーの溶出端を実用上十分な精度で一直線上に揃えることができる。

【0029】なお、平板18によって、キャピラリーアレーを同一平面内に保持する場合の固定方法は接着法だけに限られない。例えば、図7に断面模式図を示すように、ゴムシート55を敷いたステンレス板等からなる第1の平板56上に複数のゲル充填キャピラリー1を所定の間隔で並べて保持し、その上に第2の平板57を載せ、その状態で第1の平板56と第2の平板57の両端部をクリップ等で挟んで固定する方法によることもできる。

【0030】上の例では2本のレーザ光40、41を、光学セル6の側面からゲル充填キャピラリーアレーの配列方向に照射した。励起用レーザ光は、ゲル充填キャピラリーアレーの作る平面と交差する方向から照射することもできる。図8及び図9は、レーザ光照射方法の他の例を示す略図である。図8及び図9において、ゲル充填

キャピラリーに泳動電圧を印加するための上下電極槽、緩衝液槽、蛍光検出系などレーザ光照射光学系以外の部分は図1と同一であるので図示を省略してある。

【0031】図8は、光学セルの蛍光検出面と同じ側から2本のレーザ光を走査して照射する例を示す。2つのレーザ光源10、11から射出したレーザ光40、41は、回転するポリゴンミラー71で反射され、光学セル6を一端から他端に向けて走査される。光学セル6の透明窓を通してセル内に入射したレーザ光は、各ゲル充填キャピラリー1の溶出端と中空キャピラリー7の入口端の間隙を順番に走査し、ゲル充填キャピラリーから溶出したDNA断片を照射する。DNA断片の蛍光標識から発せられた蛍光は、前記した位置分解能を有する蛍光検出器で検出される。

【0032】図9は、光学セルの蛍光検出面と同じ側から2本のシート状レーザ光40、41を照射する例を示す。鉛直方向に配置された2つのレーザ光源10、11から発せられたレーザ光40、41は、わずかに異なる鉛直方向入射角をもってミラー72に入射し、ミラー72で反射されたのちF θ レンズ73によってシート状のビームとされ、光学セル6内のゲル充填キャピラリー1の溶出端と中空キャピラリー7の入口端の間に集光される。2本のビーム40、41はシースフローの流れる方向に0.5mm程度離れた位置で各ゲル充填キャピラリー1から溶出したDNA断片を照射する。この場合においても、DNA断片の蛍光標識から発せられた蛍光は、前記した位置分解能を有する蛍光検出器で検出される。

【0033】〔実施の形態2〕図10は、ゲル充填キャピラリーと中空キャピラリーとを交互に配置したキャピラリーアレーシートを用いた他の例の全体構成図である。この例では、溶出端付近でゲル充填キャピラリーと中空キャピラリーとを交互に隣接させて配置することで、ゲル充填キャピラリーのピッチ精度を向上すると共に、中空キャピラリーからシースフローを形成するため緩衝液を供給することにより、ガラス間隙内で安定なシースフローを生成する。

【0034】この例のキャピラリーアレーDNAシーケンサは、ゲル充填キャピラリー1、緩衝液槽20、上部電極槽21、下部電極槽22、電源5、光学セル24、光学セルと下部電極槽とを接続する中空キャピラリー7、一端側を緩衝液槽に浸漬し他端側はゲル充填キャピラリーと交互に配置した中空キャピラリー26、レーザ光源10、レーザ光源10からのレーザ光を光学セルに導くミラー27、レーザ光源11、レーザ光源11からのレーザ光を光学セルに導くミラー28、29、蛍光集光レンズ12、蛍光用フィルタ14、像分割プリズム15、結像レンズ13、蛍光検出器16、コンピュータ17からなる。

【0035】各ゲル充填キャピラリー1は、試料注入端を図示しない試料容器中の試料に浸漬して電圧を印加す

ることでDNA試料を電界注入され、そののち試料注入端は上部電極槽21に挿入される。次いで、電源5を動作させて上部電極槽21と下部電極槽22の間に電圧を印加することで、電界注入されたDNA試料はゲル充填キャピラリー1中を電気泳動して分離される。緩衝液は緩衝液槽20から中空キャピラリー26に送られて光学セル24中を満たし、下部の中空キャピラリー7へと流入し、下部電極槽22へ排出される。

【0036】分離されたDNA試料がこの光学セル24を通過するとき、ミラー28、29より導かれたレーザ光41、及びミラー27により導かれたレーザ光40の照射を受け、試料を標識している蛍光体が励起され蛍光を発する。この蛍光発光は、集光レンズ12、垂直方向に並べられた複数枚の蛍光用フィルタ14、各蛍光毎に像を分ける像分割プリズム15及び結像レンズ13を通り、蛍光検出器16に到達し検出される。集光レンズ12、蛍光用フィルタ14、像分割プリズム15、結像レンズ13、蛍光検出器からなる蛍光検出系は図1で説明したのと同じものである。検出された信号はコンピュータ17へ送られて解析され、試料の塩基配列が決定される。

【0037】図11は光学セルの部分の詳細説明図、図12はその側断面図である。光学セル24は、ゲル充填キャピラリー1と中空キャピラリー26のアレーを同一平面上に保ち、キャピラリー端部から長い距離にわたって安定なシースフロー39を形成して、すべてのDNA試料を安定に照射するためにキャピラリーアレーを2枚の無蛍光石英ガラス板24a、24bでサンドイッチした形になっている。この光学セル24の内部間隔、すなわち石英ガラス板24aと24bの間隔は約0.21mmで、キャピラリー管の外径と一致させた。ゲル充填キャピラリー1及び中空キャピラリー26は、平板18に固定されている。平板18は、図示省略した装置の枠体に固定されたガイド部材51a、51bの案内溝に挿入することによって装置に固定される。なお、図には平板18が光学セル24に接して固定されているように描いてあるが、平板18の固定位置は光学セル24から離れた位置であっても構わない。

【0038】安定なシースフロー39をつくるため、ゲル充填キャピラリー1と中空キャピラリー26を交互に並べたものと、中空キャピラリー7を並べたものを互いに約5mm離し、光学セル24の無蛍光石英ガラス板24a、24bで挟まれた平面上に対向させた。ゲル充填キャピラリー1の上端は上部電極槽21に、上側中空キャピラリー26の上端は緩衝液槽20に、下側中空キャピラリー7の下端は下部電極槽22にそれぞれ挿入されている。

【0039】緩衝液は、落差によって緩衝液槽20から上側中空キャピラリー26を通り抜け、光学セル24の内部で各々のゲル充填キャピラリー1からでてくるDN

A試料に対してシースフロー39を形成し、下側中空キャピラリー7を通り抜け、下部電極槽22へと排出される。ゲル充填キャピラリー1には電源5から電圧が印加されており、分離されたDNA断片38はゲル充填キャピラリー1の中を電界により移動しシースフロー39中へと泳動する。シースフロー39中に出てきたDNA断片38は、シースフロー39によって互いに混ざり合うことなく、下側中空キャピラリー7へと移動する。このシースフロー39部分にはレーザー光40、41が互いに重なることなく照射されている。

【0040】上側中空キャピラリー26は、緩衝液をゲル充填キャピラリーの間から均一に流して安定なシースフロー39を作る役目と、ゲル充填キャピラリー1と交互に並べることでゲル充填キャピラリー1を等間隔に並べる役目を持つ。図11では、下側中空キャピラリー7は間隔を開けずに並んでいるが、シースフロー39の流入はゲル充填キャピラリー1と対向するものにしか生じないようにしてある。しかし、これと異なり全ての中空キャピラリー7にシースフローが流入するようにしても構わない。

【0041】図示した装置はシースフロー39が上から下に向かって流れる構造となっているが、装置全体を逆さにしたり、斜めや横にして、シースフローが下から上、横方向等に流れるようにしても良い。また必ずしも上側と下側のキャピラリーの数が同じである必要はなく、さらにはゲル充填キャピラリーを同じ径で同じピッチで並べたり、違う径で同じピッチに並べる等任意である。また電極は、下部電極槽22の中に限らず光学セル24中に配置することも可能である。

【0042】ここでは、ゲル充填キャピラリー1と緩衝液を流すための中空キャピラリー26とを交互に隣接させて配置することで、ゲル充填キャピラリーのピッチ精度を向上すると共に安定なシースフローを生成した。同様のことは、中空キャピラリーの代わりにキャピラリー保持部材を兼ねる構造部材を用いても実現することができる。図13～図15を用いて、この変形例について説明する。

【0043】この変形例においては、ゲル充填キャピラリーの溶出端付近をキャピラリー保持部材によって固定して保持する。図13はキャピラリー保持部材の構成要素を示す斜視図、図14はキャピラリー保持部材の全体図である。キャピラリー保持部材80は、図13に示すように、平行な溝83、84を形成した2つの溝付部材81、82を、その溝が形成された面を対向させて接合したものである。溝83はゲル充填キャピラリー1の外径と同じ寸法を有し、溝付部材81の一つおきの溝83に溶出端を溝83から少し突出させてゲル充填キャピラリー1を配置する。そして、もう一方の溝付部材82を接合することにより、溶出端を一直線上に揃えて、定められたピッチで配置されたゲル充填キャピラリーアレー

が組み立てられる。溝84は、保持部材80の幅方向に貫通する孔となる。

【0044】図15は、キャピラリー保持部材80を用いたマルチキャピラリーDNAシーケンサのセル部分の断面模式図である。キャピラリー保持部材80の上部には緩衝液容器50が固定されている。キャピラリー保持部材80の下部は2枚の無蛍光石英ガラス板24a、24bで挟まれ、光学セル24が形成されている。光学セル24の下端には、複数本の中空キャピラリー7が図11と同様に接続されている。キャピラリー保持部材80の溝84によって形成される孔は緩衝液容器50と光学セル24を連通し、光学セル24内に均一な緩衝液の流れを発生する。ゲル充填キャピラリー1で分離されたDNA断片38は、こうして形成された安定なシースフローによってレーザー光40、41の照射位置まで運ばれる。以上述べたいずれの例においても、励起用レーザー光は、図8又は図9に示すように、ゲル充填キャピラリーアレーの作る平面と交差する方向から照射することもできる。

【0045】〔実施の形態3〕以上の例は計測部にシースフローを用いた測定系についてのものであるが、本発明は計測部にシースフローを用いない多数キャピラリー同時照射の測定系にも有効である。これには、ゲル充填キャピラリーの被覆を剥がし、その被覆のないゲル充填キャピラリー部分を光照射する場合と、ゲル充填キャピラリー端部を中空キャピラリーにつなげ、中空キャピラリーを光照射する場合とがある。ここではゲル充填キャピラリーと中空キャピラリーを縦列に並べた例を示す。

【0046】図16は光学セルの部分の模式図、図17はその断面図である。平板18によって平面状に保持された多数本のゲル充填キャピラリー1は、その溶出端を2枚の無蛍光透明ガラス板91a、91bで挟まれて一直線上に並べられている。ゲル充填キャピラリー1に対向して配置される透明な中空キャピラリー92は、その被覆を除去し、グリセリン94で満たされたガラス間隙に並べられる。グリセリン94は仕切板93で区切られた光学セル90の下方領域に満たされ、ゲル充填キャピラリー1と中空キャピラリー92の間隙を含む仕切板93の上方領域には緩衝液が満たされている。

【0047】DNA断片はゲル充填キャピラリー1で分離された後に中空キャピラリー92に入り、横からレーザー光により照射される。キャピラリー92表面でのレーザー光40、41の散乱、屈折はグリセリンのため少なくなり、中空キャピラリー92内を移動する全てのDNA断片38を複数のレーザー光で安定に照射することができる。中空キャピラリー92の周囲に充填する物質は、グリセリンの代わりに、ガラスの屈折率に近い屈折率1.2～1.6の物質としてもよい。

【0048】この例の場合、レーザー光は屈折率の異なる領域を通過するので、十分絞られた細いビームであるこ

とと、全てのキャピラリーが平面上に配置されていて光が直進できることが重要である。全てのキャピラリーを平面上に配置することは、ガラス板等でキャピラリーを挟むことにより達成される。レーザ光を照射するキャピラリーの回りをガラスの屈折率に近い物質で満たしている場合は、レーザ光を複数のゲル充填キャピラリーに同時照射することも可能である。

【0049】

【発明の効果】以上説明したように本発明によれば、複数のレーザ光を分離してシースフロー上で照射することにより、マルチキャピラリーDNAシーケンサの感度とスループットを上げることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明によるマルチキャピラリーDNAシーケンサの一例の全体構成を示す図。

【図2】図1の光学セルの部分の詳細説明図。

【図3】光学セルの断面図。

【図4】DNA断片の塩基長と移動速度の関係を示した図。

【図5】光学セルの他の例の模式図。

【図6】光学セルの他の例の断面模式図。

【図7】キャピラリーアレイ固定方法を説明する断面図。

【図8】励起光照射方法の他の例を示す略図。

【図9】励起光照射方法の他の例を示す略図。

【図10】本発明によるマルチキャピラリーDNAシーケンサの他の例の全体構成を示す図。

【図11】図10の光学セルの部分の詳細説明図。

【図12】光学セルの断面模式図。

【図13】キャピラリー保持部材の構成要素を示す斜視図。

【図14】キャピラリー保持部材の全体図。

【図15】キャピラリー保持部材を用いたマルチキャピラリーDNAシーケンサのセル部分の断面模式図。

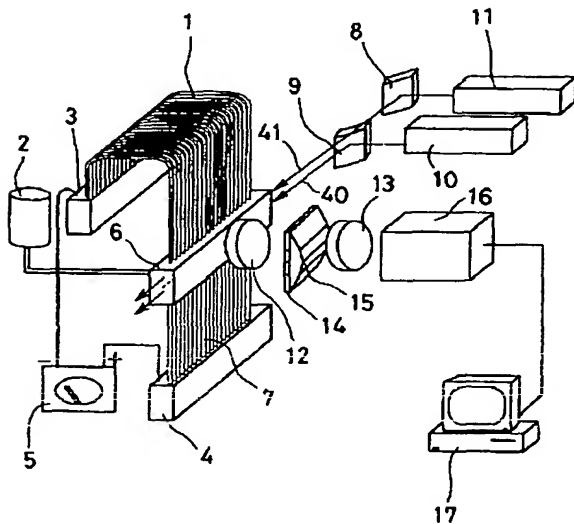
【図16】本発明によるマルチキャピラリーDNAシーケンサの他の例の光学セル部分の詳細図。

【図17】光学セルの断面図。

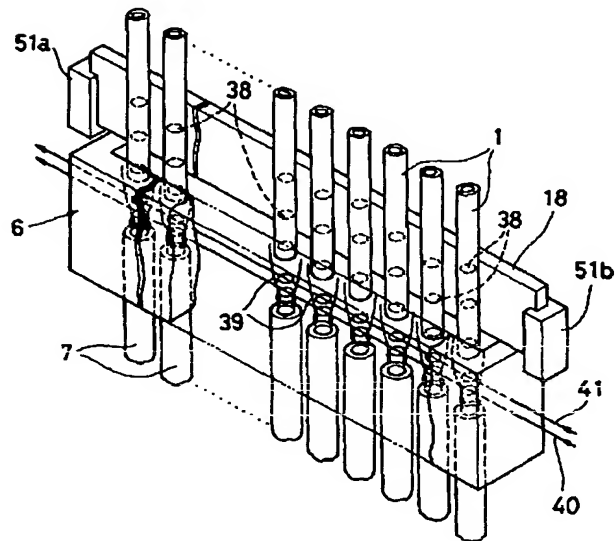
【符号の説明】

1…ゲル充填キャピラリー、2…緩衝液槽、3…上部電極槽、4…下部電極槽、5…電源、6…光学セル、7…中空キャピラリー、10、11…レーザ光源、12…集光レンズ、13…結像レンズ、14…蛍光用フィルタ、15…像分割プリズム、16…蛍光検出器、17…コンピュータ、18…平板、20…緩衝液槽、21…上部電極槽、22…下部電極槽、24…光学セル、26…中空キャピラリー、38…DNA断片、39…シースフロー、40、41…レーザ光、50…緩衝液容器、51a、51b…ガイド部材、55…ゴムシート、56、57…平板、61…平板、62…押圧部材、63…圧縮バネ、71…ポリゴンミラー、72…ミラー、73…F θ レンズ、80…キャピラリー保持部材、81、82…溝付部材、83、84…溝、90…光学セル、92…中空キャピラリー、93…仕切板、94…グリセリン

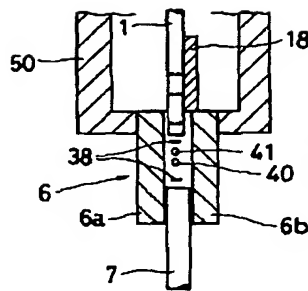
【図1】



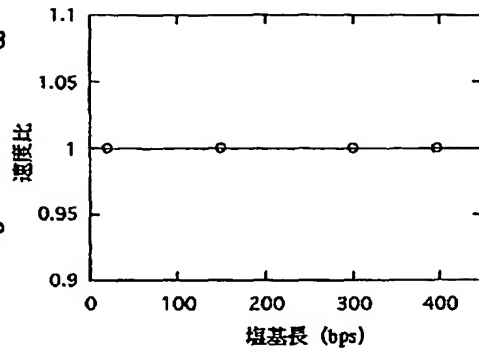
【図2】



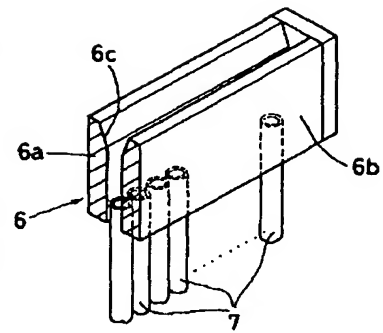
【図3】



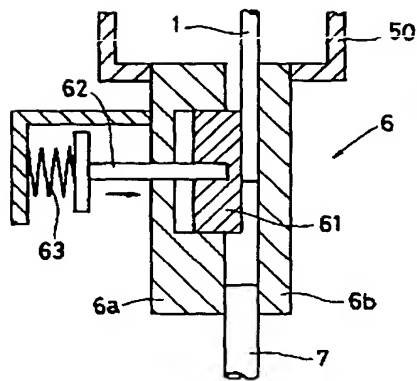
【図4】



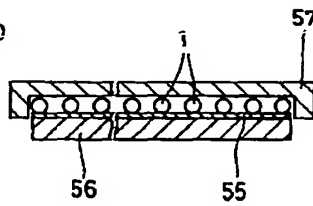
【図5】



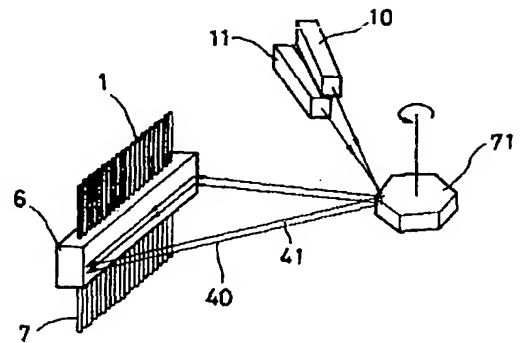
【図6】



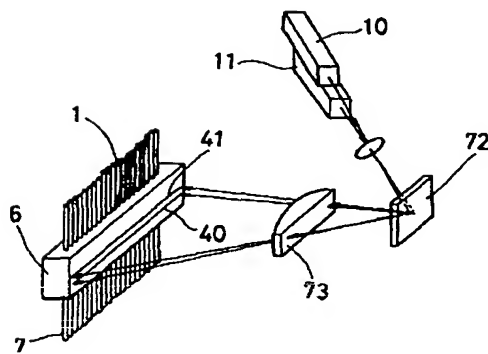
【図7】



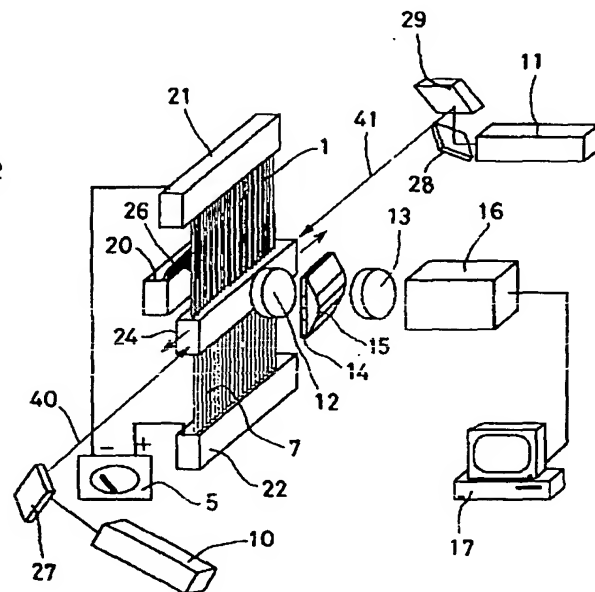
【図8】



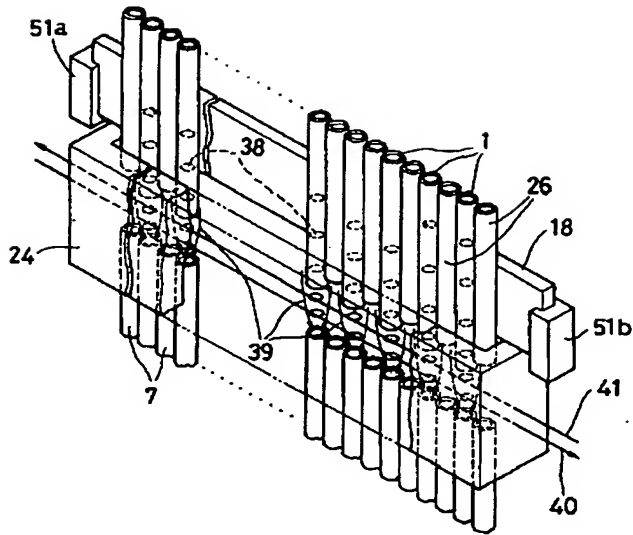
【図9】



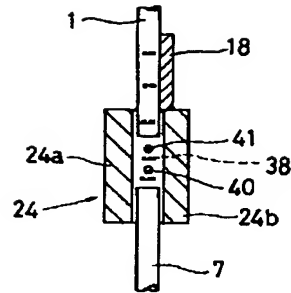
【図10】



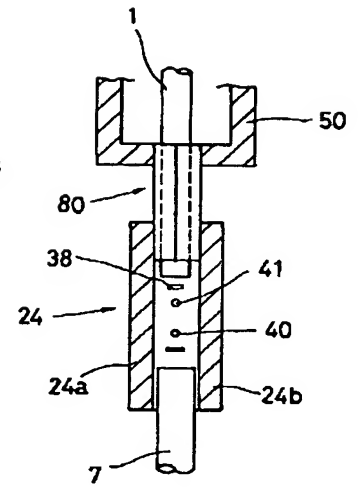
【図11】



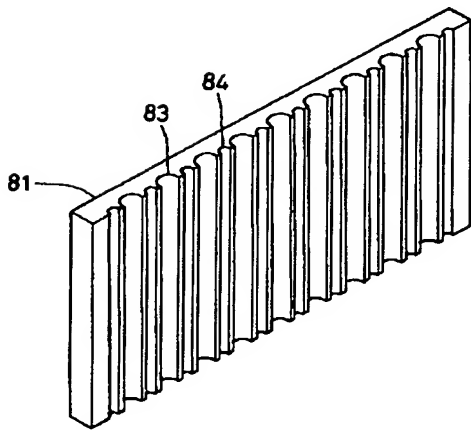
【図12】



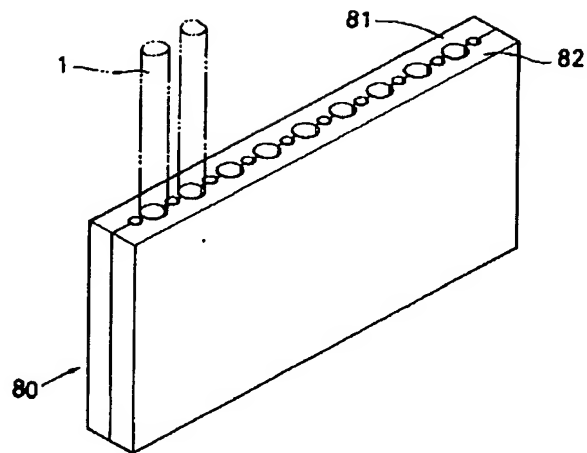
【図15】



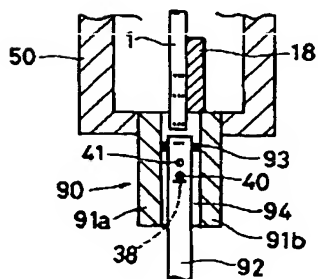
【図13】



【図14】



【図17】



【图 16】

